

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C08F 291/08, 285/00, B01J 20/32	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/31549 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 10. Oktober 1996 (10.10.96)
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/01278</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 7. April 1995 (07.04.95)</p> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: MÜLLER, Egbert (DE/DE); Elbestrasse 70, D-64390 Erzhausen (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MACK, Margot (DE/DE); Gartenstrasse 13, D-64689 Grasellenbach (DE). POGUNTKE, Peter (DE/DE); Steingärten 23, D-64853 Otzberg 5 (DE). LUBDA, Dieter (DE/DE); Im Bangert 21 c, D-64625 Bensheim (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.</p>	
<p>(54) Title: DENDRIMERIC GRAFT POLYMERS</p> <p>(54) Bezeichnung: DENDRIMERE PFROPFPOLYMERISATE</p> <div style="text-align: center; margin: 20px 0;"> $\begin{array}{c} \text{-(CR}^1\text{R}^2\text{-CR}^3\text{)-} \\ \\ \text{O=C-O-(CH}_2\text{)}_n\text{-CH-CHR}^4 \\ \quad \\ \text{X} \quad \text{X} \end{array} \quad \text{(II)}$ </div> <div style="text-align: center; margin: 20px 0;"> $\begin{array}{c} \text{-(CR}^1\text{R}^2\text{-CR}^3\text{)-} \\ \\ \text{Y} \end{array} \quad \text{(III)}$ </div> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns dendrimeric graft polymers based on base carriers containing hydroxyl groups and on the surfaces of which polymers are covalently bound, the following conditions applying: a) the base carrier contains aliphatic hydroxyl groups; b) the covalently bound polymers are bound by an end-position monomer unit to the basic carrier; c) the polymers at the branching points of the dendrimeric structure contain monomer units of formula (II); and d) the dendrimeric polymers contain monomer units of formula (III); R¹, R², R³ independently of one another stand for H or CH₃, R⁴ stands for H, C₁-C₅ alkyl or C₆-C₁₂ aryl, n is an integer between 1 and 5, one group X is OH and the other group X is an end-position monomer unit of a further polymer chain, and Y stands for a group containing a separation effector. The invention also concerns the production of these dendrimeric graft polymers and their use as separating agents for liquid chromatography.</p>		

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft dendrimere Pffropfpolymerisate auf der Grundlage von hydroxylgruppenhaltigen Basisträgern, auf deren Oberflächen Polymere kovalent gebunden sind, wobei a) der Basisträger aliphatische Hydroxylgruppen enthält, b) die kovalent gebundenen Polymeren über eine endständige Monomereinheit an den Basisträger gebunden sind, c) die Polymeren an den Verzweigungsstellen der dendrimeren Struktur Monomereinheiten der Formel (II) enthalten, d) die dendrimeren Polymeren Monomereinheiten der Formel (III) enthalten, worin R^1 , R^2 und R^3 unabhängig voneinander H oder CH_3 , R^4 H, C_1 - C_5 -Alkyl oder C_6 - C_{12} -Aryl, n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5, ein Rest X OH und der andere Rest X eine endständige Monomereinheit einer weiteren Polymerkette darstellt, und Y einen Rest, der einen Separationseffektor enthält, bedeuten. Die Erfindung betrifft weiterhin die Herstellung dieser dendrimeren Pffropfpolymerisate und ihre Verwendung als Trennmaterialien für die Flüssigkeitschromatographie.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LJ	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Dendrimere Pfropfpolymerisate

Die Erfindung betrifft dendrimere Pfropfpolymerisate und ihre Verwendung als Trennmaterialien für die Flüssigkeitschromatographie.

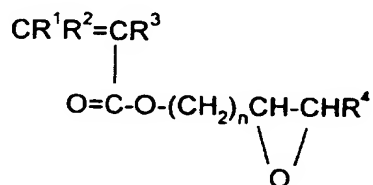
5

Aus DE 38 11 042 sind Trennmaterialien für die Chromatographie bekannt, die lineare Propfpolymere aufweisen. Diese Materialien weisen gegenüber Trennmaterialien, die vernetzte Polymere enthalten, deutliche Vorteile auf. Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, Trennmaterialien mit verbesserten Eigenschaften bereitzustellen.

10

Aus DE 43 10 964 sind oxiranhaltige aktivierte Trägermaterialien bekannt, bei denen Monomere der Formel I auf einen hydroxylgruppenhaltigen Basisträger aufgepfropft sind,

15



20

worin

R¹, R² und R³ unabhängig voneinander
H oder CH₃,

25 R⁴ H, C₁-C₅-Alkyl oder C₆-C₁₂-Aryl
und

n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5
bedeuten.

30 Es wurde gefunden, daß sich diese aktivierten Trägermaterialien zu den erfindungsgemäßen Pfropfpolymerisaten mit dendrimerer Struktur umsetzen lassen. Dabei werden auf das bekannte Pfropfpolymerisat mit linearer Polymerkette (Polymerkette erster Generation) wiederum lineare Polymere aufgepfropft (Polymerkette zweiter Generation), wobei dieser Schritt mehr-
35 fach wiederholt werden kann (Polymerkette höherer Generation).

So entstehen verzweigte Pfropfpolymere, die jedoch keine Vernetzung aufweisen. Zusätzlich werden, entsprechend den vorgesehenen chromatographischen Trennverfahren, Separationseffektoren eingeführt. Die resultierenden Trennmaterialien weisen verbesserte Eigenschaften auf.

5

Die für die verschiedenen chromatographischen Trennungsmethoden notwendigen Separationseffektoren sind als feste Phase an einen Basisträger gebunden und gehen unterschiedlich starke Wechselwirkungen mit den Analyten der Probe ein. Für verschiedene chromatographische Trennungsmethoden sind dem Fachmann geeignete Separationseffektoren bekannt; beispielsweise: ionische oder ionenbildende (ionogene) Gruppen für die Ionenaustauschchromatographie, Affinitätsliganden für Affinitätschromatographie, wozu auch die Metallchelatchromatographie gehört, hydrophobe Gruppen für die hydrophobe Interaktionschromatographie oder reversed phase Chromatographie und vorwiegend netzartige poröse hydrophile Gruppen für die Gelpermeationschromatographie. Für die Abtrennung von niedermolekularen Analyten aus proteinhaltigen Matrices sind Materialien mit hydrophilen und hydrophoben Bereichen bekannt, die entweder durch ihre Porenstruktur (US 4,544,485; EP 0 173 233) oder durch hydrophile Abschirmung (US 5,277,813) die unerwünschte Bindung der Proteine an die hydrophoben Bereiche vermeiden.

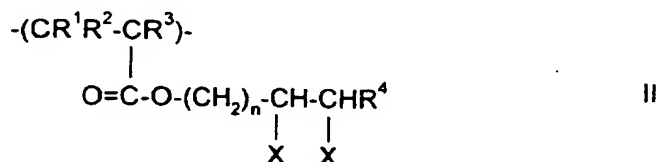
20

Gegenstand der Erfindung sind dendrimere Pfropfpolymerisate auf der Grundlage von Hydroxylgruppenhaltigen Basisträgern, auf deren Oberflächen Polymere kovalent gebunden sind, wobei

25

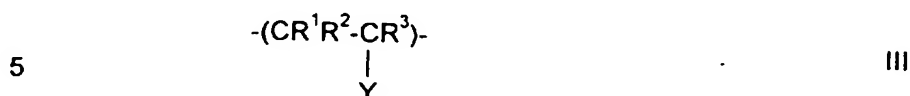
- a) der Basisträger aliphatische Hydroxylgruppen enthält,
- b) die kovalent gebundenen Polymeren über eine endständige Monomereinheit an den Basisträger gebunden sind,
- c) die Polymeren an den Verzweigungsstellen der dendrimeren Struktur Monomereinheiten der Formel II enthalten

30



35

- d) und die dendrimeren Pfropfpolymerisate Monomereinheiten der Formel III enthalten,



worin

R¹, R² und R³ unabhängig voneinander

10 H oder CH₃,

R⁴ H, C₁-C₅-Alkyl oder C₆-C₁₂-Aryl,

n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5,

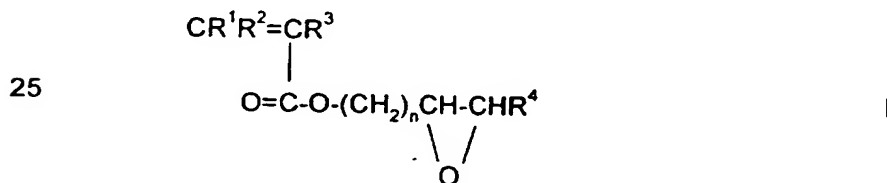
ein Rest X OH und der andere Rest X eine endständige Monomereinheit einer weiteren Polymerkette darstellt,

15 und

Y einen Rest, der einen Separationseffektor enthält, bedeuten.

Die erfindungsgemäßen dendrimeren Pfropfpolymerisate sind erhältlich durch folgende Reaktionsschritte:

- 20 a) Aufpfropfung von Monomeren der Formel I auf einen hydroxylgruppenhaltigen Basisträger in Gegenwart von Cer-IV-Ionen,



30 worin R¹, R², R³, R⁴ und n die bereits genannten Bedeutungen besitzen;

- b) zumindestens teilweise Umsetzung der Oxirangruppen in Diolgruppen;
c) Aufpfropfung von weiteren Monomeren, beispielsweise von weiteren Monomeren der Formel I, oder auch Monomeren, die Separationseffektoren enthalten, in Gegenwart von Cer-IV-Ionen;

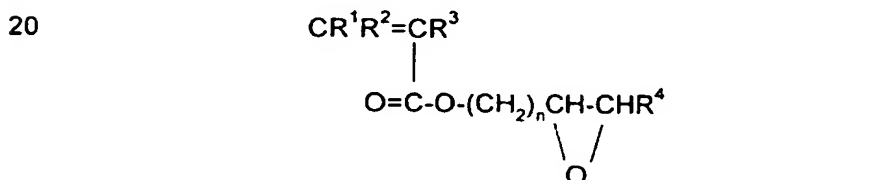
35

- d) optionale, auch mehrfache Wiederholung der Schritte b) und c);
 e) Einführung von Resten mit Separationseffektoren, soweit diese nicht bereits durch die Aufpfropfreaktion mit Monomeren, die Separationseffektoren enthalten, eingeführt sind;
 5 f) optionale Ringöffnung verbliebener Oxirangruppen.

Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen dendrimeren Pfropfpolymerisaten bei der Trennung von Gemischen mindestens zweier Substanzen, insbesondere zur Trennung von Biopoly-
 10 meren, mittels Flüssigkeitschromatographie, insbesondere mittels Ionenaustausch- und Affinitätschromatographie. Eine weitere erfindungsgemäße Verwendung ist die Abtrennung von niedermolekularen Analyten aus proteinhaltigen Matrices.

15 Gegenstand der Erfindung sind auch Verfahren zur Herstellung von dendrimeren Pfropfpolymerisaten mit folgenden Verfahrensschritten:

- a) Aufpfropfung von Monomeren der Formel I auf einen hydroxylgruppenhaltigen Basisträger in Gegenwart von Cer-IV-Ionen,



25

worin

R¹, R² und R³ unabhängig voneinander
 H oder CH₃,

R⁴ H, C₁-C₅-Alkyl oder C₆-C₁₂-Aryl

30

und

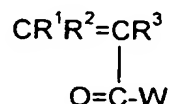
n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5

bedeuten, wobei aus DE 43 10 964 bekannte aktivierte Trägermaterialien entstehen,

35

- b) zumindest teilweise Umsetzung der Oxirangruppen in Diolgruppen;
 c) Aufpfropfung von Monomeren der Formel I oder von Monomeren der Formel V auf die in Schritt b) entstandenen Diolgruppen in Gegenwart von Cer(IV)ionen,

5



V

10

worin

W

OH oder NHR⁸

und

R⁸

C₁-C₁₀-Alkyl, das mit einem Amino-, Monoalkylamino-,
 Dialkylamino-, Trialkylammonium-, Carboxyl- oder
 Sulfonsäurerest substituiert ist,

15

bedeuten,

wobei die Schritte b) und c) einmal oder auch mehrfach wiederholt
 werden können,

20

- d) Einführung der Reste, die die Separationseffektoren enthalten, soweit
 diese nicht bereits durch die Aufpfropfreaktion mit Monomeren der
 Formel V erfolgt ist

und

- e) optionale Ringöffnung verbliebener Oxirangruppen

25

Gegenstand der Erfindung sind Verfahren zur Trennung von Gemischen
 mindestens zweier Substanzen, insbesondere zur Trennung von Biopoly-
 meren, mittels Flüssigkeitschromatographie, insbesondere mittels Ionen-
 austausch-, hydrophober Interaktions- oder Affinitätschromatographie,
 unter Verwendung der erfindungsgemäßen dendrimere Pfropfpoly-
 30 merisaten. Weitere erfindungsgemäße Verfahren betreffen die Abtrennung
 von niedermolekularen Analyten aus proteinhaltigen Matrices mit Hilfe von
 erfindungsgemäßen dendrimere Trennmaterialien.

35

Abbildung 1 zeigt die Abhängigkeit von Selektivität α (Kurve A) und Bindungskapazität (Kurve B) von diethylamin-substituierten (DEA) Ionenaustauschern mit verschiedenem Verzweigungsgrad (Probennummer als Abzisse). Die experimentellen Einzelheiten finden sich in Anwendungsbeispiel A. Es zeigt sich, daß die Selektivität von verzweigtem Material deutlich höher ist als von unverzweigtem Material. Die Bindungskapazität nimmt, verglichen mit unverzweigten Vergleichsmaterial, bei geringer Verzweigung zu, fällt aber bei starker Verzweigung deutlich ab.

Die Abbildungen 2 und 3 zeigen den Versuchsaufbau für die Abtrennung von Analyten aus biologischen Matrices, beispielsweise Serum oder Plasma, unter Verwendung von erfindungsgemäßen Trennmaterialien. Abbildung 4 zeigt die Ergebnisse eines Wiederfindungsversuchs unter Verwendung eines nach Beispiel 9 hergestellten Trennmaterials. Nähere experimentelle Einzelheiten finden sich in Anwendungsbeispiel B.

Die erfindungsgemäßen dendrimeren Pfropfpolymerisate zeichnen sich durch eine baumartig verzweigte Struktur aus, wobei ein erstes lineares Polymer auf einen Basisträger, der aliphatische Hydroxylgruppen enthält, aufgepfropft ist. Dabei werden Monomere der Formel I, wobei die Reste R^1 , R^2 , R^3 und R^4 , sowie n die bereits genannten Bedeutungen besitzen, in Gegenwart von Cer-IV-Ionen aufgepfropft, wobei ein lineares Pfropfpolymerisat entsteht. Die Grundzüge dieser Reaktion sind von G. Mino und S. Kaizerman (1958) J. Polymer Science **31**, 242-243, und G. Mino et al. (1959) J. Polymer Science **38**, 393-401, beschrieben. Das Polymer enthält zunächst Oxiranreste, die anschließend vollständig oder teilweise zu Diolgruppen umgesetzt werden. Dazu wird eine Behandlung mit verdünnter Schwefelsäure bevorzugt.

Auf die somit entstandenen aliphatischen Hydroxylgruppen dieses Polymers (erste Generation) können nun erneut Monomere der Formel I in Gegenwart von Cer-IV-Ionen aufpolymerisiert werden. Das resultierende Polymer (zweite Generation) ist in sich selbst linear. Die Gesamtstruktur ist jedoch verzweigt.

Um zu noch stärker verzweigten dendrimeren Pfropfpolymerisaten zu gelangen, können die genannten Arbeitsschritte wiederholt werden: Umsetzung der Oxirangruppen in Diolgruppen und Polymerisation von Monomeren der Formel I in Gegenwart von Cer-IV-Ionen.

5

Zusätzlich werden die für die chromatographischen Trennungen notwendigen Separationseffektoren eingeführt, die als feste Phase an einen Basisträger gebunden sind, und die unterschiedlich starke Wechselwirkungen mit den Analyten der Probe eingehen. Für verschiedene chromatographische Trennungsmethoden sind dem Fachmann geeignete Separationseffektoren bekannt, beispielsweise:

10

a) Für die Ionenaustauschchromatographie sind ionische Gruppen wie beispielsweise quaternäre Ammoniumalkylgruppen und die SO_3 -Gruppe, sowie ionogene Gruppen, die unter bestimmten pH-Bedingungen Ionen bilden, bekannt. Zu der letzten Gruppe gehören beispielsweise die alkylierten Aminogruppen, sowie die Carboxyl- und die Phosphorsäuregruppe.

15

b) Für die Affinitätschromatographie sind dem Fachmann sehr viele Affinitätsliganden bekannt, die jeweils mit dem Analyten eine strukturell gegebene Bindung eingehen, und die als Separationseffektoren geeignet sind, beispielsweise:

20

Tabelle 1:

	<u>Affinitätsligand</u>	<u>Analyt (Beispiel)</u>
25	Protein A	Immunglobuline
	Concanavalin A	Glycoproteine
	Biotin	Avidin/Streptavidin
	Avidin	Biotin
	Streptavidin	Biotin
30	5'-Adenosinmonophosphat	NAD-abhängige Oxidoreduktasen
	2',5'-Adenosindiphosphat	NADP-abhängige Oxidoreduktasen
	Aminoacridin	RNA oder DNA

35

Tabelle 1 (Fortsetzung):

	<u>Affinitätsligand</u>	<u>Analyt (Beispiel)</u>
	Boronsäure	Katecholamine
	Boronsäure	glykosyliertes Hämoglobin
5	Iminodiessigsäure	Metalloproteine
	"thiophile" Liganden	Immunglobuline
	Cibachromblau	monoklonale Antikörper
10	c) Für die hydrophobe Interaktionschromatographie sind ungeladene hydrophobe Separationseffektoren üblich, beispielsweise C ₁ -C ₂₀ -Alkyl, C ₆ -C ₂₅ -Aryl, C ₇ -C ₂₅ -Alkylaryl oder C ₇ -C ₂₅ -Arylalkyl, die auch einfach oder mehrfach mit Nitril oder C ₁ -C ₅ -Alkoxy derivatisiert sein können, wobei auch eine oder mehrere nicht benachbarte CH ₂ -Gruppen durch NH oder O oder auch eine oder mehrere CH-Gruppen durch N ersetzt sein können, oder Polyoxyethylen- oder Polyoxypropylenderivate [(CH ₂) _m -O] _o -R ⁹ , worin m 2 oder 3, o eine ganze Zahl zwischen 1 und 200 und R ⁹ H oder C ₁ -C ₅ -Alkyl bedeuten. Bevorzugt werden besonders Reste mit mittlerer oder geringer Hydrophobizität. Diese Reste können als Alkyl- oder Arylreste, als Alkoxy- oder Aroxyreste oder als Alkoyl- oder Aroylreste eingeführt werden.	
15		
20		
25	d) Für die Gelpermeationschromatographie werden hydrophile Verbindungen, die vorzugsweise Poren oder Netzwerke ausbilden, als Separationseffektor benutzt. Dazu gehören (Meth)acrylsäurederivate wie Acrylamid oder Methacrylamid, ferner (2,3-Dihydroxypropyl)-methacrylat oder N-(2-Methoxyethyl)acrylamid oder N-(2,3-Dihydroxypropyl)-acrylamid. Außerdem gehören dazu vinylierte Heterocyclen, wie z.B. 1-Vinylimidazol, N-Vinylpyrrolidon, 2-Vinylpyridin, 4-Vinylpyridin, 4-Vinylpyrrolidon-N-oxid.	
30		
35	e) Für die Abtrennung von niedermolekularen Substanzen aus biologischen Proben (z.B. Urin oder Blut) werden sogenannte abgeschirmte Phasen verwendet. Diese Trennmaterialien weisen sowohl hydrophobe als auch hydrophile Bereiche auf. Dabei treten die hydrophoben Bereiche, deren Struktur den oben (siehe c)) erwähnten hydrophoben Trennmaterialien entspricht, in Wechselwirkung mit den	

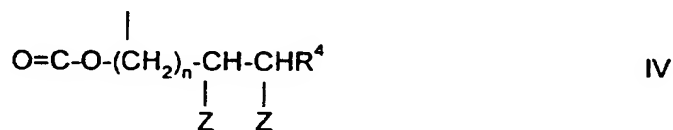
niedermolekularen Analyten der Probe. Die hydrophilen Bereiche verhindern die Wechselwirkung der hochmolekularen Anteile der Probe (z.B. der Proteine) mit den hydrophoben Bereichen. Dendrimere Pfropfpolymerisate entsprechend der vorliegenden Erfindung eignen sich in hervorragender Weise als abgeschirmten Phasen für die Abtrennung von Analyten aus biologischen Matrices.

Zur Einführung der Separationseffektoren sind verschiedene Reaktionswege möglich:

- a) Die Separationseffektoren werden durch Reaktion mit den Oxiranresten, die nach der Polymerisation mit Verbindungen der Formel I vorhanden sind, in den Träger eingebaut; z.B.:
 - a1) die Reaktion mit schwefliger Säure oder ihren Salzen oder mit primären, sekundären oder tertiären Aminen, wobei Ionenaustauscher entstehen;
 - a2) die Reaktion mit Iminodiessigsäure oder die Einführung thiophiler Liganden, oder anderer Affinitätsliganden wie Protein A, wobei Träger für die Affinitätschromatographie entstehen;
 - a3) die Reaktion mit Alkoholen, Phenolen oder auch primären Aminen, wobei hydrophobe Trennmaterialien entstehen.

Hydrophobe Separationseffektoren lassen sich beispielsweise auch durch Esterbindungen an Hydroxylgruppen, wie sie durch Hydrolyse der Oxiranreste entstehen, einführen.

Bei der Reaktionsfolge nach a1) entstehen beispielsweise Verbindungen, bei denen der Rest Y aus Formel III die Bedeutung von Formel IV besitzt,



worin

R^4 H, C_1 - C_5 -Alkyl oder C_6 - C_{12} -Aryl,

n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5,

ein Rest Z OH und der andere Rest Z einen Rest, ausgewählt aus der

5 Gruppe NR^5R^6 , $N^+R^5R^6R^7$, PO_4H_2 und SO_3H ,

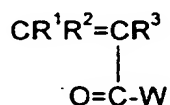
und

R^5 , R^6 und R^7 unabhängig voneinander

C_1 - C_4 -Alkyl, wobei einer oder beide Reste R^5 oder R^6
auch H sein kann,

10 bedeuten.

- b) Bei der letzten Pffropfpolymerisation können statt der Monomeren der
Formel I die aus DE 38 11 042 bekannten Monomeren eingesetzt
werden, wobei die aus dieser Druckschrift bekannten Gruppen als
Separationseffektoren eingeführt werden. Dazu gehören beispiels-
15 weise Monomeren der Formel V,



V

20

worin

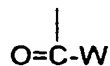
W OH oder NHR^8

und

R^8 C_1 - C_{10} -Alkyl, das mit einem Amino-, Monoalkylamino-, Dialkyl-
25 amino-, Trialkylammonium-, Carboxyl- oder Sulfonsäurerest
substituiert ist,

bedeuten.

In den nach Verfahrensvariante b) hergestellten Trägermaterialien bedeutet
30 der Rest Y aus Formel III einen Rest nach Formel VI,



VI

35

worin

W OH oder NHR^8

und

5 R^8 C_1 - C_{10} -Alkyl, das mit einem Amino-, Monoalkylamino-, Dialkylamino-,
Trialkylammonium-, Carboxyl- oder Sulfonsäurerest substituiert ist,
bedeuten.

Bevorzugte Monomere der Formel V sind solche, bei denen W eine der
10 folgenden Bedeutungen besitzt: OH, $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$,
 $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$, $\text{NHC}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$ oder $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$.

Nachdem die beschriebenen Umsetzungen ausgeführt wurden, können
gegebenenfalls noch verbliebene Oxiranreste hydrolysiert werden,
beispielsweise durch eine abschließende Behandlung mit verdünnter
15 Schwefelsäure.

Auch ohne weitere Ausführungen wird davon ausgegangen, daß ein Fach-
mann die obige Beschreibung in weitesten Umfang nutzen kann. Die bevor-
zugten Ausführungsformen sind deswegen lediglich als beschreibende,
20 keineswegs als in irgendeine Weise limitierende Offenbarung aufzufassen.

Die vollständige Offenbarung aller vor- und nachstehend aufgeführten
Anmeldungen, Patente und Veröffentlichungen, insbesondere der
deutschen Anmeldung P 43 34 351, eingereicht am 08.10.1993, sind durch
25 Bezugnahme in diese Anmeldung eingeführt.

Die folgenden Beispiele sollen den Gegenstand näher erläutern; diese
Beispiele stellen keine Einschränkung des Erfindungsgegenstandes dar.
30

35

Beispiele

Herstellungsbeispiele

- 5 In den folgenden Herstellungsbeispielen bedeutet Raumtemperatur (RT) 15-30 °C. Die Polymerisation wird in einem Dreihalskolben geeigneter Größe, der mit Rührer, Tropftrichter und Thermometer ausgerüstet ist, ausgeführt. Gewaschen wird durch Absaugen auf einer Glasfritte (G2).

10

Beispiel 1: Herstellung eines oxiran-aktivierten Trägers ausgehend von Fractogel®-TSK HW 65 (S)

- 15 Zu einer Suspension aus 100 ml sedimentiertem Fractogel®-TSK HW 65 (S) und 66 ml Wasser werden mit 3 g Ammoniumcer(IV)nitrat (gelöst in einer Mischung aus 180 ml Wasser und 3 g HNO₃ (65 %)) bei Raumtemperatur unter starkem Rühren vermischt. Nach 1 Minute erfolgt die Zugabe einer Lösung von 6 g (2,3-Epoxypropyl)-methacrylat in 44 ml Dioxan. Es wird eine Stunde weitergerührt. Anschließend wird das Reaktionsprodukt
- 20 zweimal mit je 200 ml Wasser, dreimal mit je 100 ml Aceton und dreimal mit je 200 ml Wasser gewaschen.

- 25 **Beispiel 2: Herstellung eines oxiran-aktivierten Trägers ausgehend von LiChrospher®-Diol**

- Die Herstellung erfolgt entsprechend Beispiel 1, LiChrospher®-DIOL (Partikelgröße 15-25 µm, Porengröße 80 nm) wird als Basisträger anstelle von Fractogel®-TSK HW 65 (S) verwendet.
- 30

35

Beispiel 3: Aufpfropfung eines Polymeren auf ein diolhaltiges Polymer (Erzeugung der dendrimeren Struktur)

Stufe 1: Überführung der Oxiran- in Diolgruppen

- 5 100 ml abgesaugtes oxiran-aktiviertem Trägermaterial hergestellt nach Beispiel 1 werden mit 200 ml 0,5 M Schwefelsäure (1 Stunde, 50 °C) hydrolysiert und somit die Oxirangruppen in Diolgruppen überführt. Anschließend wird dreimal mit je 200 ml Wasser gewaschen.

Stufe 2: Aufpfropfen einer weiteren Polymerkette

- 10 Zu einer Suspension aus 100 ml sedimentiertem Material aus Stufe 1 und 66 ml Wasser werden mit 3 g Ammoniumcer(IV)nitrat (gelöst in einer Mischung aus 180 ml Wasser und 3 g HNO₃ (65 %)) bei Raumtemperatur unter starkem Rühren vermischt. Nach 1 Minute erfolgt die Zugabe einer
- 15 Lösung von 6 g (2,3-Epoxypropyl)-methacrylat in 44 ml Dioxan. Es wird eine Stunde weitergerührt. Anschließend wird das Reaktionsprodukt zweimal mit je 200 ml Wasser, dreimal mit je 100 ml Aceton und dreimal mit je 200 ml Wasser gewaschen.

- 20 Es resultiert ein einfach verzweigtes dendrimäres Material mit Oxiranresten.

Beispiel 4: Aufpfropfung eines Polymeren auf ein diolhaltiges Polymer (Erzeugung von mehrfach verzweigten dendrimeren Strukturen)

25

Das Material aus Beispiel 3 wird nochmals der in Beispiel 3 beschriebenen Reaktionsfolge unterworfen. Es entsteht ein zweifach verzweigtes dendrimäres Material mit Oxiranresten.

30

Dieses Material kann wiederum der in Beispiel 3 beschriebenen Reaktionsfolge unterworfen werden. Dabei entstehen dendrimäre Materialien mit Oxiranresten und mit höhergradiger Verzweigung.

35

**Beispiel 5: Synthese eines mit Diethylamin substituierten
dendrimeren Trennmaterials**

5 100 ml abfiltriertes Gel hergestellt nach Beispiel 3 (einfach verzweigt)
werden in 100 ml Wasser suspendiert und 100 ml Diethylamin zugegeben.
Anschließend wird 20 Stunden bei Raumtemperatur weitergerührt. Danach
wird das Reaktionsprodukt zweimal mit je 100 ml Wasser gewaschen.

10 Das gewaschene Reaktionsprodukt wird in 100 ml einer 0,5 M Schwefel-
säurelösung suspendiert und zwei Stunden bei 40 °C langsam gerührt.
Danach wird mit 0,25 M Phosphatpuffer (pH 7) bis zum Neutralpunkt,
anschließend mit Wasser gewaschen. Das Gel wird in wäßriger Suspension
unter Zusatz von 0,02 % Natriumazid gelagert.

15

**Beispiel 6: Synthese eines mit Diethylamin substituierten, zweifach
verzweigten dendrimeren Trennmaterials**

20 100 ml abfiltriertes Gel hergestellt nach Beispiel 4 (zweifach verzweigt)
werden in wie in Beispiel 5 beschrieben mit Diethylamin umgesetzt.

In entsprechender Weise sind auch höher verzweigte mit Diethylamin
substituierte dendrimere Trennmateriale zugänglich.

25

**Beispiel 7: Herstellung eines Affinitätsträgers für die
Metall-Chelat-Chromatographie**

30 Eine Lösung von 15 g NaOH und 25 g Iminodiessigsäure in 100 ml Wasser
wird mit konzentrierter HCl auf pH 11 eingestellt und mit 1 g Aktivkohle
entfärbt. Zu dieser Lösung werden 50 ml abgesaugtem oxiran-aktiviertem
Trägermaterial hergestellt nach Beispiel 4 (zweifach verzweigt) gegeben.
Die Lösung wird bei 45 °C 20 Stunden gerührt. Das Reaktionsprodukt wird
abgenutscht, mit je 250 ml 0,5 M NaOH und mit Wasser gewaschen. Die
35 nicht umgesetzten Oxirangruppen durch Behandlung mit 100 ml 0,5 M
Schwefelsäure (2 Stunden, 45 °C) hydrolysiert.

Anschließend wird das Affinitätsträgermaterial einmal mit 100 ml 0,5 M Schwefelsäure, zweimal mit 100 ml Wasser, einmal mit 100 ml 0,5 M Phosphatpuffer pH 7 und einmal mit 100 ml 1 M NaCl-Lösung gewaschen. Das Gel wird in 0,02 M Phosphatpuffer pH 7 mit einem Zusatz von 1 M NaCl und 0,02 % NaN₃ gelagert.

Beispiel 8: Herstellung eines sauren Ionenaustauschers

Stufe 1:

100 ml Gel hergestellt nach Beispiel 3 werden in 160 ml 0,5 M Schwefelsäure suspendiert und eine Stunde bei 45 °C gerührt. Anschließend wird dreimal mit je 500 ml Wasser gewaschen.

Stufe 2:

10 g NaOH werden in 200 ml Wasser gelöst und 2-Acrylamido-2-methylpropansulfonsäure zugefügt, bis der pH 4 beträgt (ca. 45 g; Monomerenlösung). Als Starterlösung für die Polymerisation werden 8,2 g Ammoniumcer(IV)nitrat in 50 ml 0,5 M Salpetersäure gelöst.

100 ml Gel aus Stufe 1 werden in der Monomerenlösung suspendiert und in einen Dreihalskolben gefüllt, die Starterlösung wird in den daran angeschlossenen Tropftrichter gefüllt. Die Apparatur wird dreimal evakuiert und mit Argon begast. Unter Rühren (150 UpM) wird nun die Starterlösung zulaufen lassen und anschließend bei 40 °C vier Stunden weitergerührt. Anschließend wird das Produkt mit 200 ml 1 M Natriumsulfit in 1 M Schwefelsäure, mit 1 l Wasser, mit 3 l 0,1 M NaOH, mit 500 ml 1 M Natriumacetatpuffer pH 7 und mit 500 ml Wasser gewaschen. Das Produkt wird in 20 mM Phosphatpuffer pH 7 mit einem Zusatz von 0,02 % NaN₃ gelagert.

Beispiel 9: Herstellung eines Trägermaterials für die Bestimmung von niedermolekularen Substanzen in biologischen Matrices

5 **Stufe 1:** Herstellung eines Glycidyoxypropyl-Trägers

10 g eines LiChrospher® Si 60, Partikelgröße 25 µm, mit einer spezifischen Oberfläche von 380 m²/g und einem mittleren Porendurchmesser von 9 nm (E. Merck, Darmstadt) werden in 50 ml Toluol suspendiert und nach Zugabe von 3,8 ml (4 mmol/m²) Glycidyoxypropyl-methyl-dimethoxysilan 5 Stunden unter Rühren am Rückfluß gekocht. Nach dem Absaugen des Materials wird es Toluol und Methanol nachgewaschen und getrocknet.

15 **Stufe 2:** Ringöffnung des Glycidyoxypropyl-Trägers zur Diol-Phase
Das erhaltene Produkt aus Stufe 1, wird in 50 ml einer 5%igen Schwefelsäure-Lösung suspendiert und zur Öffnung des Epoxyringes 3 Stunden unter langsamen Rühren am Rückfluß gekocht. Nach dem Absaugen der Reaktionssuspension, wird mit Wasser sulfatfrei gewaschen und nach nochmaligem Auswaschen mit Methanol getrocknet. Man erhält einen Diol-Träger (Kohlenstoffgehalt 7,6 %; entsprechend 2,81 mmol/m² Diol-Gruppen).

20 **Stufe 3:** Erste Pfropfpolymerisation
Zu einer Suspension aus 40 ml sedimentiertem LiChrospher®-Diol aus Stufe 2 und 60 ml Wasser werden mit 0,8 g Ammoniumcer(IV)nitrat (gelöst in einer Mischung aus 40 ml Wasser und 1,2 g HNO₃ (65 %)) bei Raumtemperatur unter starkem Rühren vermischt. Nach 1 Minute erfolgt die Zugabe einer Lösung von 1,2 g (2,3-Epoxypropyl)-methacrylat in 15 ml Dioxan. Es wird eine Stunde weitergerührt. Anschließend wird das Reaktionsprodukt zweimal mit je 200 ml Wasser, dreimal mit je 100 ml Aceton und dreimal mit je 200 ml Wasser gewaschen.

Stufe 4: Schwefelsäurehydrolyse

40 ml Gel aus Stufe 3 werden in 160 ml 0,5 M Schwefelsäure suspendiert und eine Stunde bei 45 °C gerührt. Anschließend wird dreimal mit je 500 ml Wasser gewaschen.

5

Stufe 5: Zweite Pfropfpolymerisation

0,8 g Ammoniumcer(IV)nitrat werden in einer Mischung aus 40 ml Wasser und 1,2 g HNO₃ (65 %) gelöst. Diese Lösung wird zu einer Suspension aus 40 ml sedimentiertem gepfropften LiChrospher®-Diol aus Stufe 4 und 60 ml Wasser bei Raumtemperatur unter starkem Rühren zugefügt. Nach 1 Minute erfolgt die Zugabe einer Lösung von 1,2 g (2,3-Epoxypropyl)-methacrylat in 15 ml Dioxan. Es wird eine Stunde weitergerührt. Anschließend wird das Reaktionsprodukt zweimal mit je 200 ml Wasser, dreimal mit je 100 ml Aceton und dreimal mit je 200 ml Wasser gewaschen.

10

15

Stufe 6: Umsetzung des dendrimeren Pfropfpolymeren mit hydrophoben Liganden

5 g des getrockneten Trägermaterials aus Stufe 5 werden bei 0 °C in trockenem Chloroform suspendiert. Zu dieser Lösung werden 60 ml getrocknetes Triethylamin zugegeben. Anschließend wird eine Lösung von 2 g Stearoylchlorid in 25 ml Chloroform, bei Kühlung auf 4 °C, innerhalb von 3 Stunden zugegeben.

20

25

Nach der Zugabe des Säurechlorids wird 48 Stunden bei Raumtemperatur nachgerührt und das Gel anschließend mit jeweils 50 ml Chloroform, Methanol, Wasser und Methanol gewaschen und getrocknet.

Stufe 7: Schwefelsäurehydrolyse

40 ml Gel aus Stufe 6 werden in 160 ml 0,5 M Schwefelsäure suspendiert und eine Stunde bei 45 °C gerührt. Anschließend wird dreimal mit je 500 ml Wasser gewaschen.

30

Auf die vorbeschriebene Weise wird ein dendrimeres shielded phase Trennmaterial bereitgestellt, dessen hydrophobe Reste durch hydrophile Diolgruppierungen abgeschirmt sind.

35

Das folgende Anwendungsbeispiel zeigt den Einfluß des Verzweigungsgrades auf Bindungskapazität und Trennvermögen des Trennmateri- als.

5 **Anwendungsbeispiel A: Einfluß des Verzweigungsgrades**

10 Einfach bis siebenfach verzweigte DEA-derivierte Trennmateri- als (Proben 2-7) werden entsprechend den Beispielen 5 und 6 hergestellt, unverzweigtes Vergleichsmateri- al (Probe 1) wird in Analogie zu Beispiel 5 hergestellt, wobei statt des dendrimeren oxiranhaltigen Polymers das
15 lineare Polymer aus Beispiel 1 benutzt wird.

15 Diese Trennmateri- als werden jeweils in eine SuperFormance[®] Glassäule (50 × 10 mm) gefüllt und mit dem Auftragepuffer (50 mM TRIS-Puffer, pH 8,3) äquilibriert. Eine Lösung von Rinderserumalbumin (10 mg/ml) in diesem Puffer wird kontinuierlich aufgetragen (Fluß: 0,5 ml/min) und das Elutionsdiagramm durch Photometrie bei 280 nm gemessen. Aus der Durchbruchkurve wird die Kapazität bestimmt. Das Trennverhalten für Rinderserumalbumin wird ebenfalls bestimmt und als Selektivitätsfaktor α
20 ausgedrückt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 1 zusammengestellt.

25 Es zeigt sich, daß die Selektivität α (Kurve A) von verzweigtem Materi- al deutlich höher ist als von unverzweigtem Materi- al. Die Bindungskapazität (Kurve B) nimmt, verglichen mit unverzweigten Vergleichsmateri- al, bei geringer Verzweigung zu, fällt aber bei starker Verzweigung deutlich ab.

Anwendungsbeispiel B: Wiederfindung von Carbamazepin in Plasma

30 a) Apparatur

Fig. 2 zeigt den apparativen Aufbau, darin bedeuten:

- | | |
|---|------------------------|
| 1. Vorsäulen-Puffer | 2. Analysen-Puffer |
| 3. HPLC-Pumpe (L-6000) | 4. HPLC-Pumpe (L-6200) |
| 5. automatischer Probengeber (AS-4000) | |
| 35 6. automatisches Umschaltventil (ELV-7000) | |
| 7. Vorsäule | 8. analytische Säule |

9. Detektor
11. Abfallbehälter
(Geräte von Fa. E.Merck, Darmstadt, Deutschland)
10. Integrator (D-2500)

5 In Fig. 3 sind die Leitungsverbindungen zwischen den Modulen in Abhängigkeit von der Stellung des Umschaltventils (6) dargestellt:
Fig. 3a: Stellung "L" (LOAD)
Fig. 3b: Stellung "I" (INJECT)

10 b) Chromatographische Bedingungen:
Vorsäule ((8); 25 x 4 mm): Trennmaterial, hergestellt nach Beispiel 9;
Vorsäulen-Puffer (1): 0,05 M Na-Phosphat (pH 5,0); analytische Säule ((8);
LiChrospher® 60 RP-select B, 5 µm, 125 x 4 mm); Analysen-Puffer (2):
0,05 M Na-Phosphat (pH 4,0)/Acetonitril (80:20; V:V); Detektion UV 210
15 nm.

c) Analysenzyklus

Nach Injektion der Plasmaprobe (100 µl) durch den automatischen
Probengeber (5) in Stellung "L" des Umschaltventils (6) gelangt die Probe
20 mit Hilfe des durch die HPLC-Pumpe (3) geförderten Vorsäulen-Puffers ((1);
Flußrate 0,5 ml/min) auf die Vorsäule (7). Der Analyt (Carbamazepin) wird
von dem Trennmaterial der Vorsäule selektiv retiniert, während Matrix-
bestandteile, insbesondere Proteine, innerhalb von 12 Minuten in den
Abfallbehälter (11) eluiert werden.

25 Nach Umschalten des Ventils (6) in Stellung "I" wird der Analyt mit Hilfe von
der HPLC-Pumpe (4) geförderten Analysen-Puffers ((2); Flußrate 0,8
ml/min) innerhalb von 5 Minuten vollständig von der Vorsäule (7) eluiert und
auf die nachgeschaltete analytische Säule (8) transferiert.

30 Nach Umschalten des Ventils (6) in die Stellung "L" erfolgt die analytische
Trennung unter isokratischen Bedingungen (Flußrate 0,8 ml/min). Die
eluierten Verbindungen werden im Detektor (9) gemessen und im Integrator
(10) ausgewertet. Gleichzeitig wird die Vorsäule mit Hilfe der HPLC-Pumpe
35 (3) für einen neuen Analysenzyklus konditioniert.

d) Ergebnis

In Fig. 4 sind die Elutionsdiagramme für

A: einen Kalibrator, der 0,5 µg Carbamazepin enthält,
und

5 B: eine Plasmaprobe (Humanplasma), die ebenfalls 0,5 µg
Carbamazepin enthält.

Wie ersichtlich, wird der Analyt in der Plasmaprobe vollständig wieder-
gefunden.

10

15

20

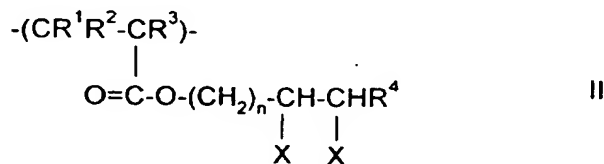
25

30

35

Ansprüche

1. Dendrimere Pfropfpolymerisate auf der Grundlage von hydroxylgruppenhaltigen Basisträgern, auf deren Oberflächen Polymere kovalent gebunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß
- a) der Basisträger aliphatische Hydroxylgruppen enthält,
 - b) die kovalentgebundenen Polymeren über eine endständige Monomereinheit an den Basisträger gebunden sind,
 - c) die Polymeren an den Verzweigungsstellen der dendrimeren Struktur Monomereinheiten der Formel II enthalten



- d) die dendrimeren Polymeren Monomereinheiten der Formel III enthalten,



worin

R¹, R² und R³ unabhängig voneinander
H oder CH₃,

R⁴ H, C₁-C₅-Alkyl oder C₆-C₁₂-Aryl,

n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5,

ein Rest X OH und der andere Rest X eine endständige Monomereinheit einer weiteren Polymerkette darstellt,

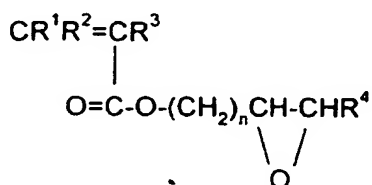
und

Y einen Rest, der einen Separationseffektor enthält, bedeuten.

2. Dendrimere Pfropfpolymerisate erhältlich durch folgende Reaktionsschritte:

a) Aufpfropfung von Monomeren der Formel I auf einen hydroxylgruppenhaltigen Basisträger in Gegenwart von Cer-IV-Ionen,

5



10

worin

R^1 , R^2 und R^3 , unabhängig voneinander

H oder CH_3 ,

15

R^4

H, C_1 - C_5 -Alkyl oder C_6 - C_{12} -Aryl

und

n

eine ganze Zahl zwischen 1 und 5

bedeuten,

20

- b) zumindestens teilweise Umsetzung der Oxirangruppen in Diolgruppen;
- c) Aufpfropfung von weiteren Monomeren, beispielsweise von weiteren Monomeren der Formel I, oder auch Monomeren, die Separationseffektoren enthalten, in Gegenwart von Cer-IV-Ionen;
- d) optionale, auch mehrfache Wiederholung der Schritte b) und c);
- e) Einführung von Resten mit Separationseffektoren, soweit diese nicht bereits durch die Aufpfropfreaktion mit Monomeren, die Separationseffektoren enthalten, eingeführt sind;
- f) optionale Ringöffnung verbliebener Oxirangruppen.

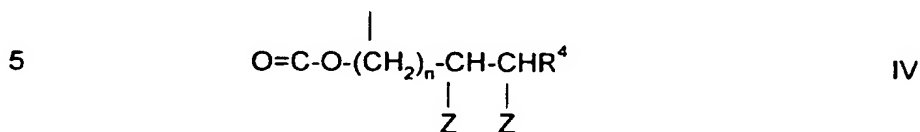
25

30

3. Dendrimere Pfropfpolymerisate nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Separationseffektor einen ionischen oder ionogenen Rest enthält.

35

4. Dendrimere Pfropfpolymerisate nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß ein Rest Y nach Formel IV enthalten ist,



worin

- 10
- R^4 H, C_1 - C_5 -Alkyl oder C_6 - C_{12} -Aryl,
 n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5,
 ein Rest Z OH und der andere Rest Z einen Rest, ausgewählt aus der Gruppe NR^5R^6 , $N^+R^5R^6R^7$, PO_4H_2 und SO_3H ,
 und
 15 R^5 , R^6 und R^7 unabhängig voneinander
 C_1 - C_4 -Alkyl, wobei einer oder beide Reste R^5 oder R^6 auch H sein kann,
 bedeuten.

- 20
5. Dendrimere Pfropfpolymerisate nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß ein Rest Y nach Formel VI enthalten ist,

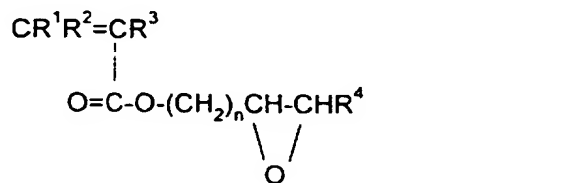


worin

- W OH oder NHR^8
 und
 30 R^8 C_1 - C_{10} -Alkyl, das mit einem Amino-, Monoalkylamino-, Dialkylamino-, Trialkylammonium-, Carboxyl- oder Sulfonsäurerest substituiert ist,
 bedeuten.

- 35
6. Dendrimere Pfropfpolymerisate nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Rest Y einen Affinitätsliganden enthält.

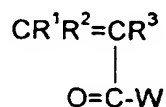
7. Dendrimere Pfropfpolymerisate nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Rest Y einen hydrophoben Rest enthält.
8. Verwendung von dendrimeren Pfropfpolymerisaten mit den Merkmalen von Anspruch 1 oder 2 bei der Trennung von Gemischen mindestens zweier Substanzen, insbesondere zur Trennung von Biopolymeren, mittels Flüssigkeitschromatographie, insbesondere mittels Ionenaustausch-, hydrophober Interaktions- oder Affinitätschromatographie.
9. Verwendung nach Anspruch 8, wobei Analyte aus biologischen Matrices abgetrennt werden.
10. Verfahren zur Herstellung von dendrimeren Pfropfpolymerisaten, gekennzeichnet durch folgende Verfahrensschritte:
- a) Aufpfropfung von Monomeren der Formel I auf einen hydroxylgruppenhaltigen Basisträger in Gegenwart von Cer-IV-Ionen,



- worin
- R^1 , R^2 und R^3 unabhängig voneinander H oder CH_3 ,
- R^4 H, C_1 - C_5 -Alkyl oder C_6 - C_{12} -Aryl
- und
- n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5 bedeuten,
- b) zumindest teilweise Umsetzung der Oxirangruppen in Diolgruppen;

- c) Aufpfropfung von Monomeren der Formel I oder von Monomeren der Formel V auf die in Schritt b) entstandenen Diolgruppen in Gegenwart von Cer(IV)ionen,

5



V

worin

10

W OH oder NHR^8

und

R^8 C_1 - C_{10} -Alkyl, das mit einem Amino-, Monoalkylamino-, Dialkylamino-, Trialkylammonium-, Carboxyl- oder Sulfonsäurerest substituiert ist,

15

bedeuten,

wobei die Schritte b) und c) einmal oder auch mehrfach wiederholt werden können,

und

20

- d) Einführung der Reste, die die Separationseffektoren enthalten, soweit diese nicht bereits durch die Aufpfropfreaktion mit Monomeren der Formel V erfolgt ist.

25

11. Verfahren zur Trennung von Gemischen mindestens zweier Substanzen, insbesondere zur Trennung von Biopolymeren, mittels Flüssigkeitschromatographie, insbesondere mittels Ionenaustausch-, hydrophober Interaktions- oder Affinitätschromatographie, unter Verwendung von dendrimeren Pfropfpolymerisaten mit den Merkmalen von Anspruch 1 oder 2.

30

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei Analyte aus biologischen Matrices abgetrennt werden.

35

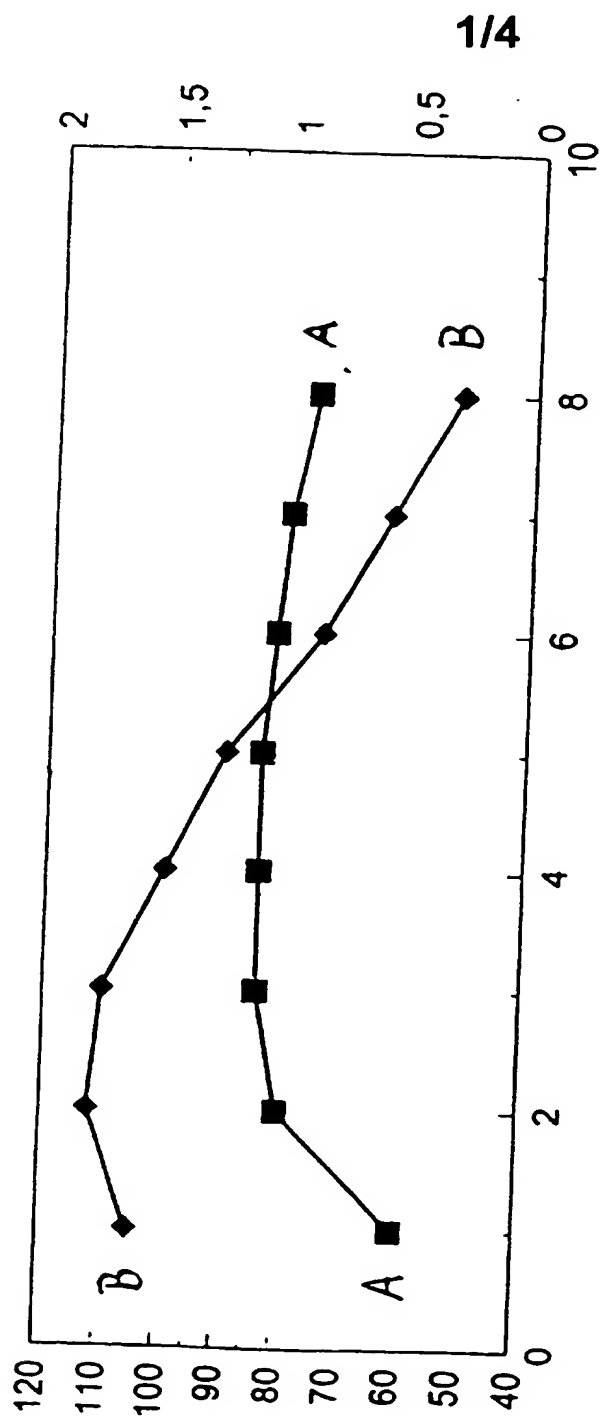
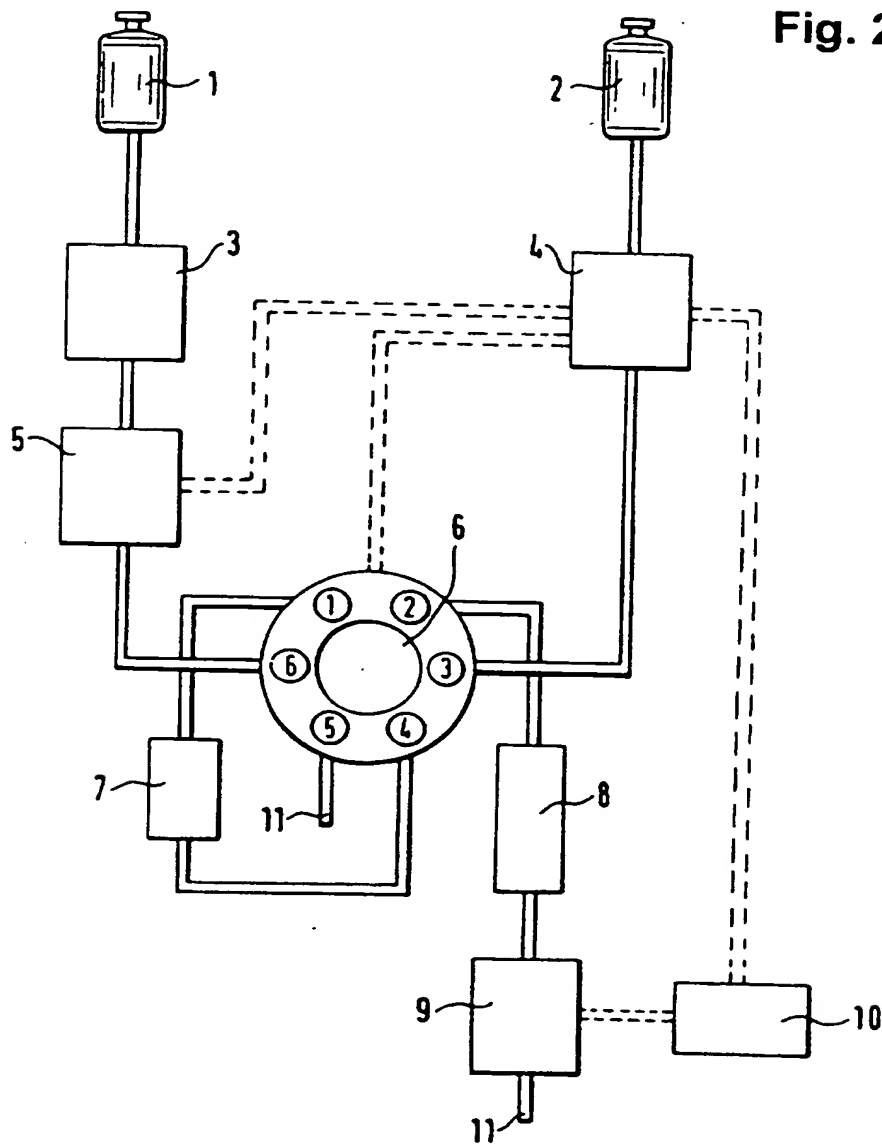


Fig. 1

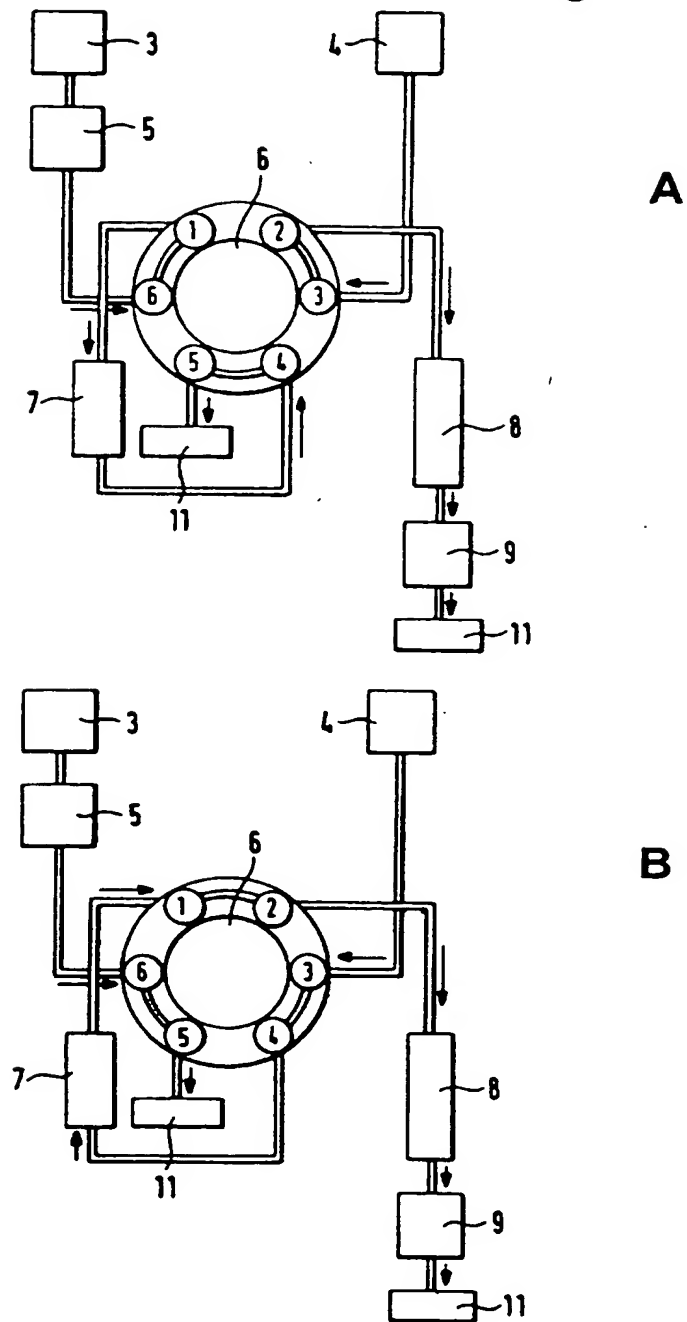
2/4

Fig. 2



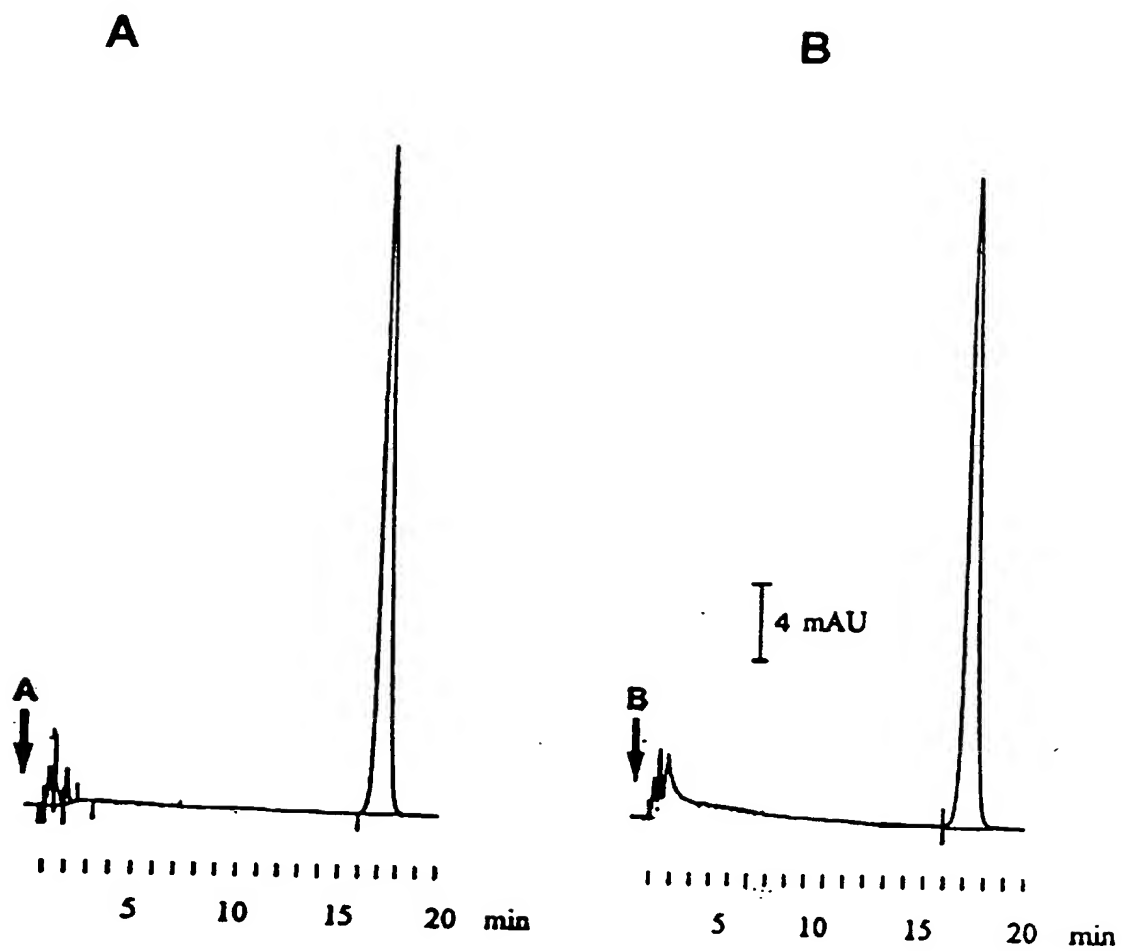
3/4

Fig. 3



4/4

Fig. 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 95/01278

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C08F291/08 C08F285/00 B01J20/32

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C08F B01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, A, 94 26379 (MERCK PATENT GMBH) 24 November 1994 see page 4, line 9 - page 5, line 23; example 2 -----	1-12

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 December 1995

Date of mailing of the international search report

15. 01. 96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Meulemans, R

...formation on patent family members

PCT/EP 95/01278

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern: des Aktenzeichens

PCT/EP 95/01278

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C08F291/08 C08F285/00 B01J20/32

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C08F B01J

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO, A, 94 26379 (MERCK PATENT GMBH) 24. November 1994 siehe Seite 4, Zeile 9 - Seite 5, Zeile 23; Beispiel 2 -----	1-12

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Field C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20. Dezember 1995

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

15. 01. 96

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Meulemans, R

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

PCT/EP 95/01278

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie) (Juli 1992)